

2/4/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

IM- \*Image available\*  
AA- 2000-293146/ 200025 |  
XR- <XRAM> C00-088669 |  
XR- <XRPX> N00-219771 |  
TI- Novel antisense nucleic acids targeted to specific sequences within  
the  
ICAM-1 gene, useful for treating inflammation and metastasis |  
PA- DEUT KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (DEKR-N) |  
AU- <INVENTORS> HAAS R; KRONENWETT R; PATZEL V; SCZAKIEL G; STEIDL U |  
NC- 088 |  
NP- 007 |  
PN- WO 200018907 A2 20000406 WO 99EP6972 A 19990921 200025 B |  
PN- DE 19844111 A1 20000420 DE 1044111 A 19980925 200026 |  
PN- AU 9961936 A 20000417 AU 9961936 A 19990921 200035 |  
PN- EP 1115858 A2 20010718 EP 99948807 A 19990921 200142 |  
<AN> WO 99EP6972 A 19990921 |  
PN- EP 1115858 B1 20030402 EP 99948807 A 19990921 200325 |  
<AN> WO 99EP6972 A 19990921 |  
PN- DE 59904870 G 20030508 DE 504870 A 19990921 200332 |  
<AN> EP 99948807 A 19990921 |  
<AN> WO 99EP6972 A 19990921 |  
PN- ES 2196864 T3 20031216 EP 99948807 A 19990921 200413 |  
AN- <LOCAL> WO 99EP6972 A 19990921; DE 1044111 A 19980925; AU 9961936 A  
19990921; EP 99948807 A 19990921; WO 99EP6972 A 19990921; EP  
99948807 A  
19990921; WO 99EP6972 A 19990921; DE 504870 A 19990921; EP 99948807  
A  
19990921; WO 99EP6972 A 19990921; EP 99948807 A 19990921 |  
AN- <PR> DE 1026110 A 19990608; DE 1044111 A 19980925; DE 1056138 A  
19981204 |  
FD- WO 200018907 A2 C12N-015/11  
<DS> (National): AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE  
DK  
EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK  
LR LS  
LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ  
TM TR  
TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW  
<DS> (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE  
LS  
LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW  
FD- AU 9961936 A C12N-015/11 Based on patent WO 200018907  
FD- EP 1115858 A2 C12N-015/11 Based on patent WO 200018907  
<DS> (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU  
LV  
MC MK NL PT RO SE SI  
FD- EP 1115858 B1 C12N-015/11 Based on patent WO 200018907  
<DS> (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL  
PT  
SE  
FD- DE 59904870 G C12N-015/11 Based on patent EP 1115858  
Based on patent WO 200018907  
FD- ES 2196864 T3 C12N-015/11 Based on patent EP 1115858 |

LA- WO 200018907 (G<PG> 28) ; EP 1115858 (G) ; EP 1115858 (G) |  
DS- <NATIONAL> AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE  
ES

FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS  
LT LU

LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR  
TT UA

UG US UZ VN YU ZA ZW|

DS- <REGIONAL> AT; BE; CH; CY; DE; DK; EA; ES; FI; FR; GB; GH; GM; GR;  
IE;

IT; KE; LS; LU; MC; MW; NL; OA; PT; SD; SE; SL; SZ; TZ; UG; ZW; AL;  
LI;

LT; LV; MK; RO; SI|

AB- <PN> WO 200018907 A2|

AB- <NV> NOVELTY - Antisense nucleic acids (I) targeted against a  
specific

nucleic acid sequence within ICAM-1, comprising at least 1 of 30  
sequences ((II)-(XXXI) of 20 nucleotides, given in the  
specification,

are new.|

AB- <BASIC> DETAILED DESCRIPTION - Novel antisense nucleic acids (I)  
targeted against a specific nucleic acid sequence within ICAM-1,  
comprising at least 1 of 30 sequences ((II)-(XXXI) of 20  
nucleotides,

given in the specification.

E.g.:

GGCGTGGCTT GTGTGTT CGG (II);  
GGAGGGCGTGG CTTGTGTGTT (VIII); and  
AAATTGGCTC CATGGTGATC (XVIII).

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) a vector containing at least 1 antisense nucleic acid as in  
(I);

(2) a host cell containing at least 1 antisense nucleic acid or  
vector as in (I) or (1); and

(3) a transgenic organism, which comprises at least 1 stably  
integrated nucleic acid in its genetic material comprising 1 of  
(I).

ACTIVITY - Cytostatic; anti-inflammatory; dermatological;  
antiviral; antirheumatic; antiarthritic; immunosuppressive;  
antipsoriatic; antiasthmatic; antitussive.

MECHANISM OF ACTION - Antisense therapy; gene therapy.

USE - The antisense nucleic acids or vectors are used to  
inhibit or

eliminate acute or chronic inflammatory diseases of humans, virus  
infection, metastasis, inflammation of the skin, mobilization of  
hematopoietic stem cells, coughs and all biological process under  
the

influence of ICAM-1, ulcerative colitis, rheumatoid arthritis,  
lupus  
erythematosus, organ rejection, graft-versus-host reaction after  
bone

marrow transplantation, psoriasis, asthma and neurodermatitis. In  
particular, the antisense nucleic acids are used to treat acute or  
chronic inflammation of gum disease. The antisense nucleic acids  
regulate or suppress ICAM-1 gene expression. The antisense nucleic  
acids or vectors can be used to suppress immune reactions against

gene

therapy using viral or non-viral vectors in mammals. The antisense nucleic acids may also be used in kits to diagnose ICAM-1 associated disturbances (claimed).

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The diagram shows ICAM-1 expression in primary umbilical cord endothelium cells.

pp; 28 DwgNo 3A/3 |

AB- <TF> TECHNOLOGY FOCUS - BIOTECHNOLOGY - Preferred Antisense Sequences:

The antisense nucleic acids contain DNA, RNA, and/or modified DNA or

RNA. |

DE- <TITLE TERMS> NOVEL; NUCLEIC; ACID; SPECIFIC; SEQUENCE; GENE; USEFUL;

TREAT; INFLAMMATION; METASTASIS |

DC- B04; D16; P14 |

IC- <MAIN> C12N-015/11; C12N-015/63 |

IC- <ADDITIONAL> A01K-067/00; A01K-067/027; A61K-031/7088; A61K-031/711;

A61K-048/00; A61P-031/00; A61P-035/00; A61P-037/00; C07H-021/00; C12N-005/10; C12Q-001/68; A61P-035-00; A61P-037-00 |

MC- <CPI> B04-E06; B04-E08; B04-F0100E; B04-P0100E; B11-C08E5; B12-K04A;

B12-K04F; B14-A02; B14-C03; B14-C06; B14-C09B; B14-G02C; B14-H01B; B14-K01A; B14-K01B; B14-N06; B14-N17C; B14-S03; D05-H09; D05-H12D2; D05-H12E; D05-H18B |

FS- CPI; EngPI ||

3073579

B14

**PCT**WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :  C12N 15/11, C07H 21/00, A61K 31/7088, C12Q 1/68, A01K 67/027 // A61P 31/00, 35/00, 37/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/18907</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. April 2000 (06.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06972		(74) Anwalt: PERREY, Ralf; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1999 (21.09.99)		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten:  198 44 111.8 25. September 1998 (25.09.98) DE 198 56 138.5 4. Dezember 1998 (04.12.98) DE 199 26 110.5 8. Juni 1999 (08.06.99) DE		(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM, STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): PATZEL, Volker [DE/DE]; Fr.-Fröbel-Strasse 10, D-63457 Hanau (DE). KRONEN- WETT, Ralf [DE/DE]; Schröderstrasse 103, D-69120 Hei- delberg (DE). STEIDL, Ulrich [DE/DE]; Mühltalstrasse 13, D-69121 Heidelberg (DE). HAAS, Rainer [DE/DE]; Fritz-Frey-Strasse 8, D-69121 Heidelberg (DE). SCZA- KIEL, Georg [DE/DE]; Beintweg 9a, D-69181 Leimen (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: ANTISENSE-SEQUENCES FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF THE ADHESION MOLECULE ICAM-1			
(54) Bezeichnung: ANTISENSE-SEQUENZEN FÜR DIE HEMMUNG DER EXPRESSION DES ADHÄSIONSMOLEKÜLS ICAM-1			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to specific antisense nucleic acids which inhibit or regulate the expression of the adhesion molecule ICAM-1 in mammalian cells, notably human cells, to vectors and host cells containing these antisense nucleic acids and to pharmaceutical compositions which contain said antisense nucleic acids and are designed to control or treat, for example, acute or chronic inflammatory diseases. The invention also relates to diagnostic kits containing the above antisense nucleic acids.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft spezifische Antisense-Nukleinsäuren, welche die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Säugetierzellen, insbesondere menschlichen Zellen, hemmen bzw. regulieren, diese Antisense-Nukleinsäuren enthaltende Vektoren und Wirtszellen sowie diese Antisense-Nukleinsäure enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen zur Hemmung oder Behandlung von beispielsweise akut oder chronisch entzündlichen Erkrankungen und diese Antisense-Nukleinsäuren enthaltende Kits für diagnostische Zwecke.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gaben	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
RJ	Brasilien	IE	Iland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BV	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von America
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikansche Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PL	Polen		
CN	China	KZ	Kasachstan	PT	Portugal		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SE	Schweden		
EE	Estland			SG	Singapur		

"Antisense-Sequenzen für die Hemmung der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1"

**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft spezifische Antisense-Nukleinsäuren, welche die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Säugerzellen, insbesondere menschlichen Zellen, hemmen, und diese Antisense Nukleinsäuren enthaltende Vektoren und Wirtszellen sowie diese Antisense-Nukleinsäure enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von insbesondere akut oder chronisch entzündlichen Erkrankungen, Virusinfektionen, Metastasierung, Entzündungen der Haut, Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen, Erkältung und alle biologischen Prozesse unter Beteiligung von ICAM-1 auf molekularer Ebene.

Entzündungen sind Reaktionen des vaskularisierten Gewebes auf Reizungen wie zum Beispiel Infektionen und mechanische Verletzungen, Beispiele für entzündliche Erkrankungen sind unter anderem Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis und Organabstossungsreaktionen, Virusinfektionen, Metastasierung, Entzündungen der Haut, Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen, Erkältung und alle biologischen Prozesse unter Beteiligung von ICAM-1 auf molekularer Ebene. Die Infiltration von Leukozyten ist ein wichtiger Schritt bei pathologischen Entzündungsreaktionen, wobei Zell-Zell-Adhäsion hierfür den initialen Schritt darstellt. Adhäsion wird durch Oberflächenproteine auf Leukozyten und der endothelialen Oberfläche in Rezeptor-Ligand-analoger Weise vermittelt. Das endothiale Oberflächenprotein ICAM-1 nimmt bei solchen Zell-Zell-Kontakten die Rolle des Rezeptors für die Leukozytenliganden CD11a/CD18, auch LFA1 genannt, und CD11b/CD18, auch Mac-1 genannt, ein. Monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-Adhäsionsmoleküle können die Adhäsion von Leukozyten und Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmen (Arfors et al. 1987 Blood 69:338-340; Vedder et al. 1988 J. Cli. Invest. 81:939-944). Bei verschiedenen Formen akuter und chronischer Entzündungen scheint daher die Hemmung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 eine therapeutische Option zu sein.

sionsmoleküls ICAM-1 erfolgversprechend.

Kausale Therapieansätze bei pathologischen Entzündungsreaktionen mit Hilfe von Substanzen, die auf molekularer Ebene eingreifen, befinden sich gegenwärtig im experimentellen Stadium. Zum Beispiel werden mit gewissem Erfolg sowohl monoklonale Antikörper gegen LFA1 getestet als auch ICAM-1-gerichtete Antisense-Oligonukleotide (Yacyshyn et al., 1998 Gastroenterology 114: 1133-1142; Stepkowski et al. 1995 Transplant. Proc. 27: 113; Kavanaugh et al., 1994 Arthritis-Reum. 37: 992-999; Arfors et al. 1987 Blood 69:338-340; Vedder et al. 1988 J. Cli. Invest. 81:939-944; Bennett et al. 1997 J. Pharmacol. Exp. Ther. 280:988-1000). Nukleinsäuren als therapeutische Moleküle haben grundsätzliche Vorteile gegenüber anderen Substanzklassen wie zum Beispiel Peptiden und Proteinen. Hierzu zählen ihre geringe oder nicht vorhandene Immunogenität bzw. Nebenwirkungen und Toxizität.

Da die Auswahl der Antisense-Sequenzen bislang eher willkürlich und ohne rationale Auswahlkriterien erfolgte, war ein großer Teil der untersuchten Sequenzen nicht effektiv. Die Effektivität von Antisense-Inhibitoren in lebenden Systemen wird durch das Assoziationsverhalten *in vitro* reflektiert. Wichtige Einflußgrößen auf das Assoziationsverhalten zwischen der Antisense-Nukleinsäure und der Target-RNA, wie beispielsweise die Zugänglichkeit der Target-RNAs für die Antisense-Nukleinsäuren, wurden nicht berücksichtigt. Ferner wurden bei den Antisense-RNAs die strukturelle Vielfalt nicht berücksichtigt und damit das Potential von effektiven Antisense-Inhibitoren nicht ausgeschöpft.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Antisense-Nukleinsäuren bereitzustellen, die eine besonders wirkungsvolle Hemmung der ICAM-1-Genexpression in Säugerzellen aufweisen.

Diese Aufgabe wird durch die in den beigefügten Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst. Insbesondere wird eine Antisense-Nukleinsäure bereitgestellt, welche gegen eine spezifische RNA-Sequenz von ICAM-1 als Target bzw. Zielmolekül gerichtet ist und mindestens eine Sequenz, ausge-

wählt aus SEQ ID NO 1-30, enthält.

Der Begriff "Antisense-Nukleinsäure" bedeutet ein natives, halbsynthetisches, synthetisches oder modifiziertes Nukleinsäuremolekül aus Desoxyribonukleotiden und/oder Ribonukleotiden und/oder modifizierten Nukleotiden.

Die lokale Zielsequenzen im ICAM-1-Gen umfassen die Positionen 1627-1671 (SEQ ID NO 31; Antisense-Nukleinsäuren mit den SEQ ID NO 1-12), 59-82 (SEQ ID NO 32; Antisense-Nukleinsäuren mit den SEQ ID NO 13-15), 593-634 (SEQ ID NO 33; Antisense-Nukleinsäuren mit den SEQ ID NO 16-23), 1219-1242 (SEQ ID NO 34; Antisense-Nukleinsäuren mit den SEQ ID NO 24 und 25), 1384-1410 (SEQ ID NO 35; Antisense-Nukleinsäuren mit den SEQ ID NO 26-28) oder 1851-1874 (SEQ ID NO 36; Antisense-Nukleinsäuren mit den SEQ ID NO 29 und 30).

Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuresequenzen zeigen eine signifikant stärkere Hemmung als die vier wirksamsten bekannten Antisense-Oligonukleotide der Fa. ISIS Inc., ("ISIS1570", "ISIS2302", "ISIS1939" und "ISIS3067") und sind daher ausgezeichnete Inhibitoren der ICAM-1 Expression in lebenden Zellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der die vorstehend definierte, erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure oder der eine entsprechende, zur Antisense-Nukleinsäure komplementäre DNA-Sequenz enthält, die nach einer Transkription in geeigneten Wirtszellen zur vorstehend definierten, erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäure führt. Der erfindungsgemäße Vektor kann vorzugsweise geeignete regulatorische Elemente, wie Promotoren, Enhancer, Terminationssequenzen, oder virale Sequenzen enthalten. In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform kann der Vektor beispielsweise (i) zur stabilen Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das genetische Material einer Wirtszelle verwendet werden und/oder (ii) für erhöhte zelluläre Aufnahme geeignet sein und/oder (iii) nukleäre Importsignale enthalten und/oder (iv) zum Zell-Zell-Transport geeignet sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, welche die erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure oder den erfindungsgemäßen Vektor enthält. Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise Säugerzellen, insbesondere menschliche Zellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche die erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure oder ein Gemisch von mindestens zwei erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren oder den erfindungsgemäßen Vektor, gegebenfalls in einem im Stand der Technik bekannten, pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel enthält. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann zur Hemmung oder Beseitigung von insbesondere akut oder chronisch entzündlichen Krankheitszuständen, beispielsweise Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Organabstoßungsreaktionen, Virusinfektionen, Metastasierung, Entzündungen der Haut, Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen, Erkältung und alle biologischen Prozesse unter Beteiligung von ICAM-1 auf molekularer Ebene, Colitis ulcerosa, Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses, "Graft-versus-host Reaktionen" nach allogener Knochenmarktransplantation, Psoriasis, Asthma, Neurodermitis durch transiente oder stabile Integration der erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäure mittels Transformation bzw. Transfektion und anderen im Stand der Technik bekannten Einschleusungsverfahren in ICAM-1 exprimierenden Wirtszellen verwendet werden. Ferner kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung auch für kosmetische Zwecke, beispielsweise zur Behandlung von Akne, verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung zur Behandlung von Parodontose bzw. entzündlichen Erkrankungen der Mundhöhle, insbesondere bei entzündlichen Zahnfleischerkrankungen verwendet werden. Die Parodontose ist eine weitverbreitete Krankheit der Mundhöhle. Zirka 20% der Bevölkerung leiden an temporären oder chronischen Zahnfleischentzündungen, die auf einer Entzündung des sog. Kontakt epithels des Zahnfleisches beruhen. Bei extremer Ausbildung dieser Entzündungen kann es durch die Einwanderung von Bakterien in das darunter gelegene Mesenchym zur Durch-

tränkung des Zahns mit Endotoxinen und letztendlich zum Zahnverlust führen. Ursachen für eine starke Entzündung des Kontaktepithels kann eine unkontrollierte Ausbreitung von mikrobiellen Plaque der Bakterienflora in der Mundhöhle sein oder ein Versagen des Immunsystems zur Hemmung von Entzündungsprozessen. In ersterem Falle wird der Patient durch mechanische Beseitigung des bakteriellen Befalls durch Säuberung des Zahnes und/oder Verabreichung von Antibiotika behandelt. Bei zirka 20% aller Parodontose-Patienten liegt jedoch eine therapieresistente Parodontitis vor, bei der keine parodontopathogenen Keime nachzuweisen sind. Hier ist die Parodontitis auf eine inadäquate Reaktion des Immunsystems auf die natürliche Ausbreitung von Plaquebakterien zurückzuführen.

Bei krankhaften Zahnfleischentzündungen werden bisher vor allem Antibiotika gegen Entzündungserreger mit wechselndem Erfolg lokal verwendet. Eine alternative Therapie bei fortgeschrittenen Stadien der Parodontose stellen sogenannte GTR-Ansätze (Guided Tissue Regeneration) dar, bei denen der Versuch unternommen wird, den durch die Erkrankung verloren gegangene Zahnhalteapparat zu regenerieren. Der Therapieerfolg hängt bei diesem Ansatz entscheidend von der Entzündungsfreiheit während der Reparationsphase ab.

Ferner können die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren zur Regulation oder Suppression der ICAM-1-Genexpression in Säugerzellen verwendet werden.

Rekombinante Adenoviren können ruhende Zellen mit hoher Effizienz infizieren und werden als virales Vektorsystem zur Einschleusung therapeutischer Gene in menschliche Zellen in der somatischen Gentherapie überprüft und experimentell angewendet. Therapeutische Strategien zielen beispielsweise auf genetische Erkrankungen der Lunge oder benutzen die schnelle Akkumulation adenoviraler Partikel in Lebergewebe. Eine der Haupthürden für die Anwendung dieses Vektorsystems ist mit der schnellen Induktion einer Immunantwort gegen den Vektor verknüpft, der auch die Funktionen des Genes für das Adhäsionsmolekül ICAM-1 einschließt. Zum Beispiel wird Lungengewebe kurz nach der Behandlung mit Adenovektoren von Zellen des Immunsystems infiltriert was zu massiven

Entzündungsreaktionen führt. Zur Überwindung der unerwünschten Immunantwort gegen adenovirale Vektoren kann daher die Anwendung von ICAM-1-gerichteten Antisense-Nukleinsäuren während der Behandlung mit adenoviralen Vektoren wesentlich beitragen.

Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren zur Unterdrückung der Immunreaktion gegen gentherapeutisch eingesetzte virale, beispielsweise adenovirale, oder nicht-virale Vektoren in Säugern, insbesondere Mensch.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein mindestens eine oder mehrere erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuren enthaltender Kit zur Diagnose von ICAM-1-assoziierten Störungen bzw. Krankheiten von Säugern, insbesondere Mensch, wobei die Antisense-Nukleinsäuren mindestens eine nachweisbare Markierung, beispielsweise an Nukleotide gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, Biotin oder Digoxigenin oder radioaktive Isotope, enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein transgener Organismus bzw. Säuger, welcher mindestens eine in das genetische Material stabil integrierte Nukleinsäure enthält, wobei diese Nukleinsäure nach der Transkription eine RNS-Sequenz, die mindestens eine Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NO 1-30 und dargestellt als RNS, umfaßt.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 zeigt die erfindungsgemäßen ICAM-1-gerichteten Antisense-Oligonukleotidsequenzen, wobei sich die Nummerierung der Sequenzpositionen auf die Referenz "Chian et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 18162-18171" bezieht. (A) zeigt die Antisense-Oligonukleotide SEQ ID NO 1-12 gegen die lokale ICAM-1-Zielsequenz pos. 1627-1671 (SEQ ID NO 31), (B) zeigt die Antisense-Oligonukleotide SEQ ID NO 13-15 gegen die lokale ICAM-1-Zielsequenz pos. 59-82 (SEQ ID NO 32), (C) zeigt die Antisense-Oligonukleotide SEQ ID NO 16-23 gegen die lokale ICAM-1-Zielsequenz pos. 593-634 (SEQ ID NO 33), (D) zeigt

die Antisense-Oligonukleotide SEQ ID NO 24 und 25 gegen die lokale ICAM-1-Zielsequenz pos. 1219-1242 (SEQ ID NO 34), (E) zeigt die Antisense-Oligonukleotide SEQ ID NO 26-28 gegen die lokale ICAM-1-Zielsequenz pos. 1384-1410 (SEQ ID NO 35) und (F) zeigt die Antisense-Oligonukleotide SEQ ID NO 29 und 30 gegen die lokale ICAM-1-Zielsequenz pos. 1851-1874 (SEQ ID NO 36).

Figur 2 ist eine graphische Darstellung der Hemmung der Genexpression von ICAM-1 in ECV304-Zellen nach Lipofectin-vermittelter Transfektion mit bekannten und erfindungsgemäßen Phosphorothioat-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden und Cytokin-Stimulation der ICAM-1 Expression. Es ist deutlich ersichtlich, daß die getesteten erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotide 1630A, C, D, E, H, I, J und L (SEQ ID NO 1, 3-8 und 10), AUGC (SEQ ID NO 5) und 1840B (SEQ ID NO 30) eine signifikant stärkere Hemmung aufweisen als beispielsweise die bekannten Antisense-Oligonukleotide ISIS1570, ISIS2302, ISIS1939 und ISIS3067 der Fa. ISIS Inc. Als Negativkontrolle "NEG" wurde ein als ungünstig vorhergesagtes ICAM-1-gerichtetes Antisense-Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-GGAAAGTGCCATCCTTAGA-3' (SEQ ID NO 37) verwendet. Die Oligonukleotide nsISIS1570 und nsISIS2302 sind von ISIS Inc. verwendete Kontrollen.

Figur 3 ist eine graphische Darstellung der ICAM-1 Expression in (A) primären Nabelschnurendothelzellen und (B) primären microaskulären Endothelzellen. "LIPO" bedeutet "Lipofectin"; "unstim" nicht-stimuliert; "stim" stimuliert.

Durch die nachfolgenden Beispiele wird die vorliegende Erfindung näher erläutert.

### Beispiel 1

Ein 60%-80% konfluenter Monolayer der Endothelzelllinie ECV304 wurde unter Verwendung des kationischen Lipids DOTMA (LIPOFECTIN, Life Technologies, Karlsruhe) entsprechend der Angaben des Hersteller mit den Oligonukleotiden transfiziert. Dabei wurden Konzentrationen von 0,1 µM Oligonukleotid sowie 5 µg/ml LIPOFECTIN und das Serum-freie Medium OptiMEM (Life Technologies)

verwendet. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend das Serum-freie Transfektionsmedium gegen Medium 199 mit 10% FCS ausgetauscht. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 h wurde das Medium erneut durch Medium 199 mit 10% FCS und 200 U/ml Interleukin 1 $\beta$  ersetzt. Nach einer Stimulationszeit von 16 h bei 37°C wurden die Endothelzellen durch eine 5-minütige Trypsinierung von der Zellkulturschale abgelöst und mit einem Phycoerythrin-gekoppelten, ICAM-1-spezifischen monoklonalen Antikörper gefärbt. Die ICAM-1-Expression wurde als mittlere Fluoreszenzintensität durchflußzytometrisch bestimmt. Das Ausmaß der Hemmwirkung eines Antisense-Oligonukleotids wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{[(\text{ICAM-1-Expression-Antisense-Oligonukleotid-behandelter, stimulierter ECV304}) - (\text{ICAM-1-Expression unbehandelter, nicht stimulierter ECV304})]}{[(\text{ICAM-1-Expression unbehandelter, stimulierter ECV304}) - (\text{ICAM-1-Expression unbehandelter, nicht stimulierter ECV304})]}$$

### Beispiel 2

Primäre Nabelschnurendothelzellen bzw. primäre microvaskuläre Endothelzellen

5 (je  $5 \times 10^4$  Zellen) wurden in 24-Well-Platten kultiviert (Medium: endothelial cell growth medium MV, PromoCell, Heidelberg) und mit Oligonukleotiden transfiziert (100 pmol, Endkonzentration 0,1 $\mu$ M; 10 $\mu$ l Lipofectin [Life Technologies]; 1 ml OPTIMEM-Medium). Nach fünfstündiger Inkubation wurden die Zellen gewaschen, in "endothelial cell growth medium MV" (PromoCell, Heidelberg) für 3 Stunden weiter inkubiert, und die ICAM-1-Expression mit rHu-IL-1 $\beta$  für 18 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen Trypsin-behandelt, mit isotonischem Puffer gewaschen und mit einem PE-konjugierten ICAM-1-gerichteten Antikörper gefärbt. Die Expression von ICAM-1 wurde durch FACS-Analyse quantifiziert. Die Ergebnisse sind für die getesteten Antisense-ODN in den beiden Balkendiagrammen dargestellt (vgl. Figuren 3A und 3B).

10

15

"Antisense-Sequenzen für die Hemmung der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1".

### **Ansprüche**

1. Antisense-Nukleinsäure, welche gegen eine spezifische Nukleinsäure-Sequenz von ICAM-1 gerichtet ist und mindestens eine Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NO 1-30, enthält.
2. Antisense-Nukleinsäure nach Anspruch 1, welche Desoxyribonukleotide und/oder Ribonukleotide und/oder modifizierte Desoxyribo- oder Ribonukleotide enthält.
3. Vektor, enthaltend mindestens eine der nach Anspruch 1 oder 2 definierten Antisense-Nukleinsäuren.
4. Wirtszelle, enthaltend mindestens eine nach Anspruch 1 oder 2 definierten Antisense-Nukleinsäuren oder den nach Anspruch 3 definierten Vektor.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend die Antisense-Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder ein Gemisch von mindestens zwei Antisense-Nukleinsäuren nach Anspruch 1 oder 2 oder den Vektor nach Anspruch 3.
6. Verwendung der Antisense-Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder des Vektors nach Anspruch 3 zur Hemmung oder Beseitigung von akut oder chronisch entzündlichen Krankheitszuständen beim Menschen, Virusinfektionen, Metastasierung, Entzündungen der Haut, Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen, Erkältung und alle biologischen Prozesse unter Beteiligung von ICAM-1 auf molekularer Ebene, Colitis ulcerosa, Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses, Organabstos-

**10**

sungsreaktionen, "Graft-versus-host-Reaktionen" nach allogener Knochenmarkstransplantation, Psoriasis, Asthma, Neurodermitis.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die akut oder chronisch entzündlichen Krankheitszustände entzündliche Erkrankungen der Mundhöhle, insbesondere entzündliche Zahnfleischerkrankungen sind.
8. Verwendung der Antisense-Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder des Vektors nach Anspruch 3 oder der pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 5 zur Regulation oder Suppression der ICAM-1-Genexpression.
9. Verwendung der Antisense-Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder des Vektors nach Anspruch 3 oder der pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 5 zur Unterdrückung der Immunreaktion gegen gentherapeutisch eingesetzte virale oder nicht-virale Vektoren in Säugern.
10. **Kit zur Diagnose von ICAM-1-assoziierten Störungen bzw. Krankheiten von Säugern, enthaltend mindestens eine oder mehrere Antisense-Nukleinsäuren nach Anspruch 1 oder 2 mit mindestens einer nachweisbaren Markierung.**
11. **Transgener Organismus, welcher mindestens eine in das genetische Material stabil integrierte Nukleinsäure enthält, wobei diese Nukleinsäure nach der Transkription eine RNS-Sequenz, die mindestens eine Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NO 1-30 und dargestellt als RNS, umfaßt.**

1/7

FIG. 1

**ICAM-1-gerichtete Antisense-Oligonukleotide - Sequenzen**

Die Nummerierung der Sequenzpositionen bezieht sich auf die  
Referenz: Chiang et al. 1991 J. Biol. Chem. 266: 18162-18171.

(A)

Lokale Zielsequenz (pos. 1627-1671):

1630	1640	1650	1660	1670
<b>5'-AAG<u>GGACCCCATGAAACC</u>GAAC<u>ACACAAGCCAC</u><u>GCGCTCCCTGAA</u>-3'</b>				

Getestete Antisense-Oligonukleotidsequenzen:

SEQ	ID No.	
1	1630A	3'-GGCTTGTGTGTTGGTGC <sup>GG</sup> -5'
2	1630B	3'-TACTTGGCTTG <sup>TG</sup> TGTT <sup>CG</sup> -5'
3	1630C	3'-TTCCCTGGGGTACTTTGGC-5'
4	1630D	3'-CCCTGGGGTACTTTGGCTT-5'
5	1630E	3'-TTGGCTTGTGTGTTGGTGC-5'
6	1630H	3'-CTTGTGTGTTGGTGC <sup>GG</sup> A <sup>G</sup> -5'
7	1630I	3'-TTGTGTGTTGGTGC <sup>GG</sup> A <sup>G</sup> GG-5'
8	1630J	3'-TGTGTGTTGGTGC <sup>GG</sup> A <sup>G</sup> GG-5'
9	1630K	3'-GTGTGTTGGTGC <sup>GG</sup> A <sup>G</sup> GGGA-5'
10	1630L	3'-TGTGTGTTGGTGC <sup>GG</sup> A <sup>G</sup> GGAC-5'
11	1630N	3'-TGTGTGTTGGTGC <sup>GG</sup> A <sup>G</sup> GGACTT-5'
12	1630P	3'-CCTGGGGTACTTTGGCTT <sup>G</sup> -5'

2/7

(B)

**Lokale Zielsequenz (pos. 59-82):**

60	70	80
<b><u>5'-CCTCAGCCTCGCTATGGCTCCCAG-3'</u></b>		

**Getestete Antisense-Oligonukleotidsequenzen:****SEQ. ID No.**

13	AUGA	3'-TCGGAGCGATAACCGAGGGTC-5'
14	AUGB	3'-AGTCGGAGCGATAACCGAGGG-5'
15	AUGC	3'-GGAGTCGGAGCGATAACCGAG-5'

(C)

**Lokale Zielsequenz (pos. 593-634):**

600	610	620	630
<b><u>5'-GGTGAGGAGAGATCACCATGGAGCCAATTCTCGTGCAC-3'</u></b>			

**Getestete Antisense-Oligonukleotidsequenzen:****SEQ ID No.**

16	650A	3'-TACCTCGGTTAAAGAGACAG-5'
17	650B	3'-CTAGTGGTACCTCGGTTAAA-5'
18	650C	3'-CCACTCCTCTCTAGTGGTAC-5'
19	650D	3'-CCTCTCTAGTGGTACCTCGG-5'
20	650E	3'-TGGTACCTCGGTTAAAGAGC-5'
21	650F	3'-GTACCTCGGTTAAAGAGCAC-5'
22	650G	3'-ACCTCGGTTAAAGAGCACGG-5'
23	650H	3'-CGGTTAAAGAGCACGGCGT-5'

3/7

(D)

**Lokale Zielsequenz (pos. 1219-1242):**

1220	1230	1240
<b><u>5'-ACAAGAACCA<u>CCAGACCCGGGAGCTTC-3'</u></u></b>		

**Getestete Antisense-Oligonukleotidsequenzen:****SEQ ID Nr.**

24	1200A	3'-TGTTCTTGGTCTGGGCCCTC-5'
25	1200B	3'-CTTGGTCTGGGCCCTCGAAG-5'

(E)

**Lokale Zielsequenz (pos. 1384-1410):**

1390	1400	1410
<b><u>5'-CACTGCCCATCGGGGAATCAGTACTG-3'</u></b>		

**Getestete Antisense-Oligonukleotidsequenzen:****SEQ ID Nr.**

26	1380A	3'-GGTAGCCCCTTAGTCACTGA-5'
27	1380B	3'-GTGACGGGTAGCCCTTAGT-5'
28	1380C	3'-GTAGCCCCTTAGTCACTGAC-5'

4 / 7

(F)

Lokale Zielsequenz (pos. 1851-1874):

1860            1870  
|                |  
5' -AAAACACTAGGCCACGCATTGAT-3'

**Getestete Antisense-Oligonukleotidsequenzen:**

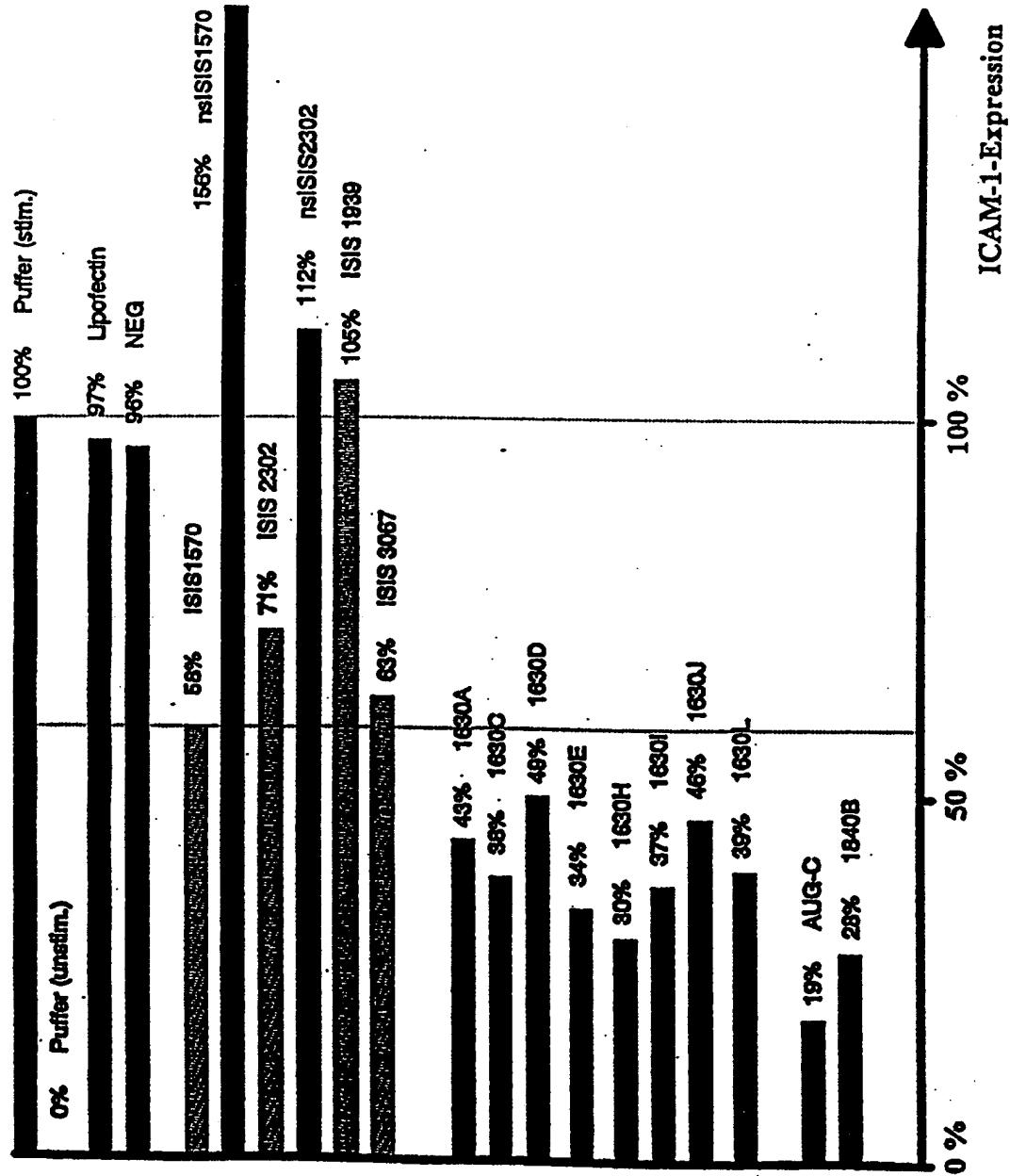
SEQ ID Nr.

29      1840A      3' -TTTGATCCGGTGCCTAG-5'

30      1840B      3' -GTGATCCGGTGCCTAGACTA-5'

5/7

FIG. 2



6/7

(A) Primäre Nabelschnurendothelzellen

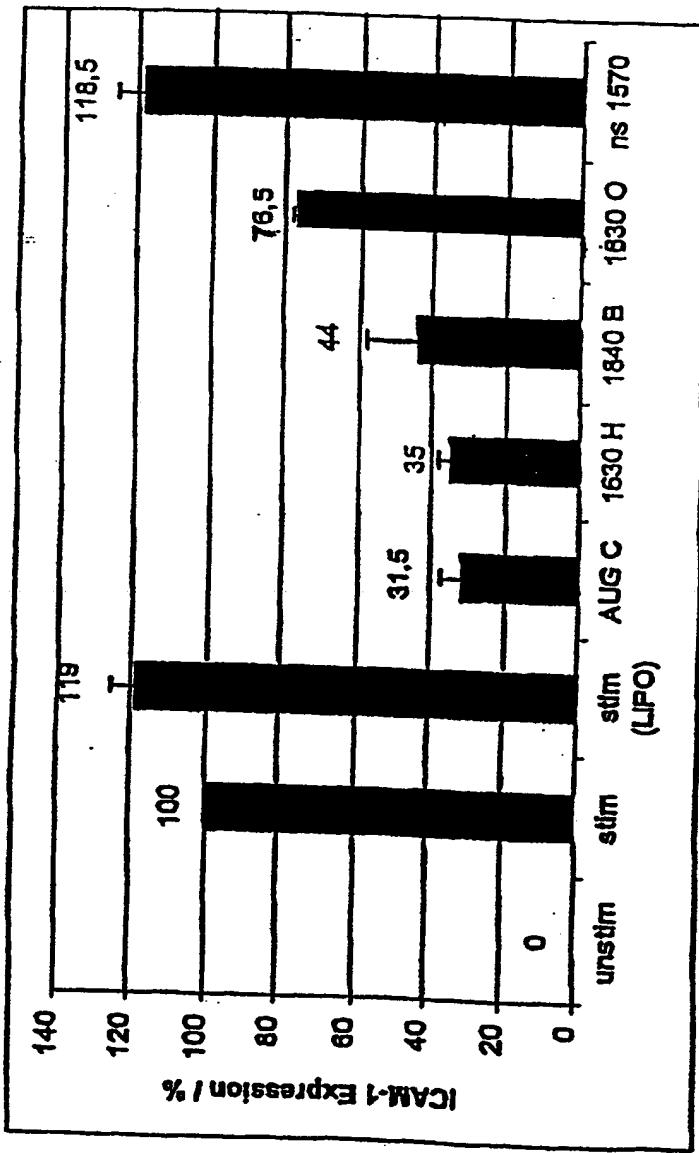
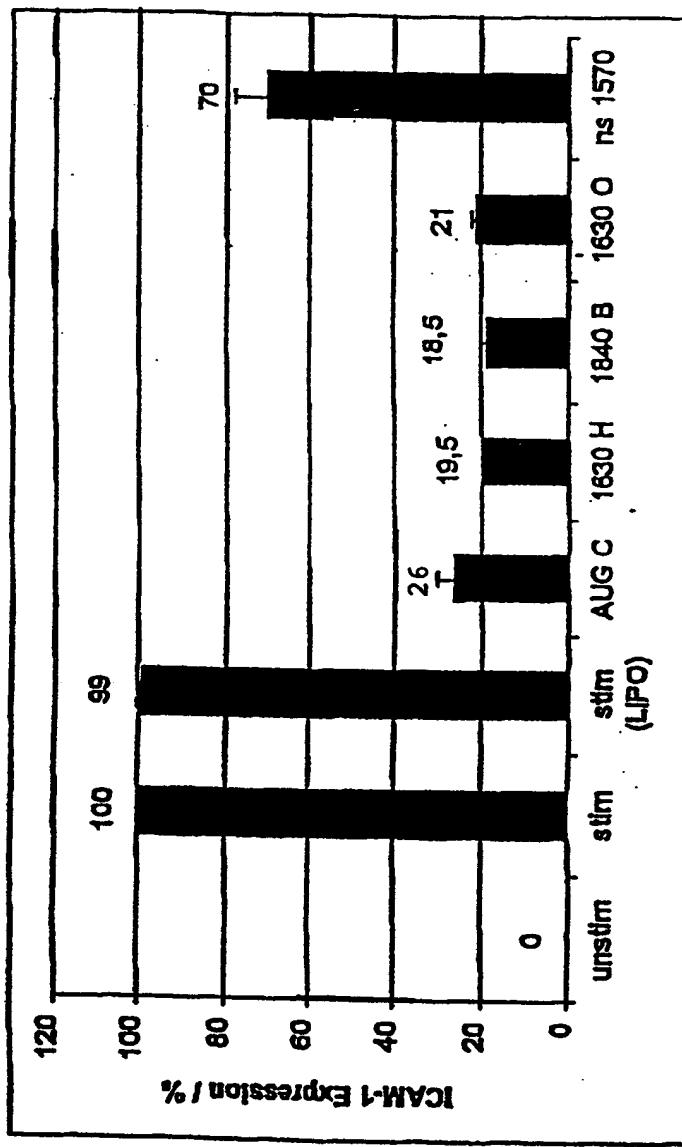


FIG. 3

7/7

(B) Primäre microvaskuläre Endothelzellen



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum

<120> Antisense-Sequenzen für die Hemmung der Expression des  
Adhäsionsmoleküls ICAM-1

<130> ICAM-1 Antisense-Oligonukleotide

<140>

<141>

<150> 19844111.8

<151> 1998-09-25

<150> 19856138.5

<151> 1998-12-04

<150> 19926110.5

<151> 1999-06-08

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcgtggctt gtgtgttcgg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gcttgtgtgt tcggtttcat

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

2

<400> 3  
cggtttcatg ggggtccctt

20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
ttcggtttca tgggggtccc

20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
cgtggtttgt gtgttcggtt

20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
gaggcgtggc ttgtgtgttc

20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
ggaggcgtgg cttgtgtgtt

20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
gggaggcgtg gcttgtgtgt

20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
agggaggcgt ggcttgtgtg

20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 10  
cagggaggcg tggcttgtgt

20

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
ttcagggagg cgtggcttgt

20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
gttcggtttc atggggtcc

20

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
ctgggagcca tagcgaggct

20

<210> 14  
<211> 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

gggagccata gcgaggctga

20

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

gagccatagc gaggctgagg

20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

gcacgagaaa ttggctccat

20

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

aaattggctc catggtgatc

20

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

catggtgatc tctcctcacc

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 19  
ggctccatgg tgatctctcc

20

<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 20  
cgagaaattg gctccatgg

20

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
cacgagaaat tggctccatg

20

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
ggcacgagaa attggctcca

20

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
gtgeggcaeg agaaattggc

20

<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 24  
ctccccggtc tggttcttgt

20

<210> 25  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 25  
gaagctcccg ggtctggttc

20

<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 26  
agtcaactgat tccccgatgg

20

<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 27  
tgattccccc atgggcagtg

20

<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
cagtcaactga ttccccgatg

20

<210> 29  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
gatgcgtggc ctagtgtttt

20

<210> 30  
<211> 20

<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
atcagatgcg tggccttagtg

20

<210> 31  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
aagggaccaccc catgaaacccg aacacacacaag ccacgcctcc ctgaa

45

<210> 32  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
cctcagcctc gatatggctc ccag

24

<210> 33  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
ggtgaggaga gatcaccatg gagccaattt ctcgtgccgc ac

42

<210> 34  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
acaagaacca gacccgggag cttc

24

<210> 35  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

8

<400> 35  
cactgccccat cggggaatca gtgactg

27

<210> 36  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
aaaacactag gccacgcattc tgat

24

<210> 37  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 37  
ggaaagtgcc atccctttaga

20

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 7 : <b>C12N 15/11, C07H 21/00, A61K 31/7088, C12Q 1/68, A01K 67/027 // A61P 31/00, 35/00, 37/00</b>		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/18907</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>6. April 2000 (06.04.00)</b>									
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/06972</b>		(74) Anwalt: PERREY, Ralf; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).										
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>21. September 1999 (21.09.99)</b>												
(30) Prioritätsdaten: <table><tr><td>198 44 111.8</td><td>25. September 1998 (25.09.98)</td><td>DE</td></tr><tr><td>198 56 138.5</td><td>4. Dezember 1998 (04.12.98)</td><td>DE</td></tr><tr><td>199 26 110.5</td><td>8. Juni 1999 (08.06.99)</td><td>DE</td></tr></table>		198 44 111.8	25. September 1998 (25.09.98)	DE	198 56 138.5	4. Dezember 1998 (04.12.98)	DE	199 26 110.5	8. Juni 1999 (08.06.99)	DE	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
198 44 111.8	25. September 1998 (25.09.98)	DE										
198 56 138.5	4. Dezember 1998 (04.12.98)	DE										
199 26 110.5	8. Juni 1999 (08.06.99)	DE										
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM, STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>										
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): PATZEL, Volker [DE/DE]; Fr.-Fröbel-Strasse 10, D-63457 Hanau (DE). KRONEN- WETT, Ralf [DE/DE]; Schröderstrasse 103, D-69120 Hei- delberg (DE). STEIDL, Ulrich [DE/DE]; Mühlthalstrasse 13, D-69121 Heidelberg (DE). HAAS, Rainer [DE/DE]; Fritz-Frey-Strasse 8, D-69121 Heidelberg (DE). SCZA- KIEL, Georg [DE/DE]; Beintweg 9a, D-69181 Leimen (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: <b>29. Juni 2000 (29.06.00)</b>										
(54) Title: ANTISENSE-SEQUENCES FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF THE ADHESION MOLECULE ICAM-1												
(54) Bezeichnung: ANTISENSE-SEQUENZEN FÜR DIE HEMMUNG DER EXPRESSION DES ADHÄSIONSMOLEKÜLS ICAM-1												
(57) Abstract												
<p>The invention relates to specific antisense nucleic acids which inhibit or regulate the expression of the adhesion molecule ICAM-1 in mammalian cells, notably human cells, to vectors and host cells containing these antisense nucleic acids and to pharmaceutical compositions which contain said antisense nucleic acids and are designed to control or treat, for example, acute or chronic inflammatory diseases. The invention also relates to diagnostic kits containing the above antisense nucleic acids.</p>												
(57) Zusammenfassung												
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft spezifische Antisense-Nukleinsäuren, welche die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Säugerzellen, insbesondere menschlichen Zellen, hemmen bzw. regulieren, diese Antisense-Nukleinsäuren enthaltende Vektoren und Wirtszellen sowie diese Antisense-Nukleinsäure enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen zur Hemmung oder Behandlung von beispielsweise akut oder chronisch entzündlichen Erkrankungen und diese Antisense-Nukleinsäuren enthaltende Kits für diagnostische Zwecke.</p>												

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbügeln der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BR	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Malta	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Malediven	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun	KR	Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estonland	LR	Liberia	SG	Singapur		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/06972

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7 C12N15/11 C07H21/00 A61K31/7088 C12Q1/68 A01K67/027 //A61P31/00, 35/00, 37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 24797 A (HOKE GLENN D ;LEE CHE HUNG (US); BRADLEY MATTHEWS O (US); DYAD PHA) 11 June 1998 (1998-06-11) page 20 -page 21 page 30, SEQ ID 7 claims	1,2,5,6, 8,9
X	LEE CH. ET AL.: "Antisense gene suppression against human ICAM-1, ELAM-1, and VCAM-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells." SHOCK 1995 JUL;4(1):1-10, XP000892942 page 3; table 1	1,2,6,8  -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "a" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the International search report
30 March 2000		14/04/2000
Name and mailing address of the ISA		Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: 31 651 890 nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Andres, S

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No PCT/EP 99/06972	
---	--

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BENNETT CF. ET AL.: "An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." J PHARMACOL EXP THER 1997 FEB;280(2):988-1000, XP002134404 cited in the application the whole document	1,2,5,6, 8,10
A	GEMMELL E. ET AL.: "Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue." J PERIODONTAL RES 1994 JAN;29(1):46-53, XP000891655 the whole document	6,7
A	WO 95 28412 A (GUSTAFSSON KENTH T ;INST OF CHILD HEALTH (GB); BAETSCHER MANFRED W) 26 October 1995 (1995-10-26) abstract; claims	11
A	WO 94 05333 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 17 March 1994 (1994-03-17) claims page 15, line 7 - line 19 page 26 -page 27	1,2,5,6, 8,9
A	CHIANG, M.-Y. ET AL.: "Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule-1 expression by two distinct mechanisms" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 266, 25 September 1991 (1991-09-25), pages 18162-18171, XP002134405 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1,2,6,8
A	PATZEL V. ET AL.: "Theoretical design of antisense RNA structures substantially improves annealing kinetics and efficacy in human cells " NAT BIOTECHNOL 1998 JAN;16(1):64-8, XP002085109	
T	PATZEL V. ET AL.: "A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability." NUCLEIC ACIDS RES 1999 NOV 15;27(22):4328-34, XP002134406	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/EP99/06972**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/EP99/06972

PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions as follows:

1. Claims: 1-11 (all in part)

Antisense nucleic acids directed against the ICAM-1 target sequence SEQ ID 31 (pos. 1627-1671), vectors, host cells, compounds, diagnostic kits and transgenic organisms containing the same and the utilization thereof.

2. Claims: 1-11 (all in part)

Antisense nucleic acids directed against the ICAM-1 target sequence SEQ ID 32 (pos. 59-82), vectors, host cells, compounds, diagnostic kits and transgenic organisms containing the same and the utilization thereof.

3. Claims: 1-11 (all in part)

Antisense nucleic acids directed against the ICAM-1 target sequence SEQ ID 33 (pos. 593-634), vectors, host cells, compounds, diagnostic kits and transgenic organisms containing the same and the utilization thereof.

4. Claims: 1-11 (all in part)

Antisense nucleic acids directed against the ICAM-1 target sequence SEQ ID 34 (pos. 1219-1242), vectors, host cells, compounds, diagnostic kits and transgenic organisms containing the same and the utilization thereof.

5. Claims: 1-11 (all in part)

Antisense nucleic acids directed against the ICAM-1 target sequence SEQ ID 35 (pos. 1384-1410), vectors, host cells, compounds, diagnostic kits and transgenic organisms containing the same and the utilization thereof.

6. Claims: 1-11 (all in part)

Antisense nucleic acids directed against the ICAM-1 target sequence SEQ ID 36 (pos. 1851-1874), vectors, host cells, compounds, diagnostic kits and transgenic organisms containing the same and the utilization thereof.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. PCT/EP99/06972
---

**ADDITIONAL MATTER****PCT/ISA/210****Continuation of box I.1**

Although claims 8 (insofar as it relates to an in vivo application), 6-7 and 9 relate to a method for the treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No	
PCT/EP 99/06972	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9824797	A 11-06-1998	AU 1564897 A EP 0950060 A		29-06-1998 20-10-1999
WO 9528412	A 26-10-1995	AU 1850599 A AU 2233295 A CA 2187802 A EP 0755402 A JP 10504442 T		29-04-1999 10-11-1995 26-10-1995 29-01-1997 06-05-1998
WO 9405333	A 17-03-1994	US 5591623 A US 5514788 A AU 673193 B AU 4840193 A AU 690858 B AU 6449896 A CA 2143748 A EP 0662003 A FI 950948 A HU 69922 A JP 2948541 B JP 9182594 A JP 2937903 B JP 9T82595 A JP 2732546 B JP 8500736 T KR 178958 B NO 950800 A NZ 256171 A US 5883082 A US 5843738 A US 5789573 A US 6015894 A		07-01-1997 07-05-1996 31-10-1996 29-03-1994 30-04-1998 05-12-1996 17-03-1994 12-07-1995 18-04-1995 28-09-1995 13-09-1999 15-07-1997 23-08-1999 15-07-1997 30-03-1998 30-01-1996 20-03-1999 24-04-1995 20-12-1996 16-03-1999 01-12-1998 04-08-1998 18-01-2097

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/06972

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12N15/11 C07H21/00 A61K31/7088 C12Q1/68 A01K67/027  
//A61P31/00, 35/00, 37/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 24797 A (HOKE GLENN D ;LEE CHE HUNG (US); BRADLEY MATTHEWS O (US); DYAD PHA) 11. Juni 1998 (1998-06-11) Seite 20 -Seite 21 Seite 30, SEQ ID 7 Ansprüche	1,2,5,6, 8,9
X	LEE CH. ET AL.: "Antisense gene suppression against human ICAM-1, ELAM-1, and VCAM-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells." SHOCK 1995 JUL;4(1):1-10, XP000892942 Seite 3; Tabelle 1	1,2,6,8 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere Bedeutung anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgewählt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

30. März 2000

14/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtiger Bediensteter

Andres, S

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/06972

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BENNETT CF. ET AL.: "An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." J PHARMACOL EXP THER 1997 FEB;280(2):988-1000, XP002134404 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,2,5,6, 8,10
A	GEMMELL E. ET AL.: "Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue." J PERIODONTAL RES 1994 JAN;29(1):46-53, XP000891655 das ganze Dokument	6,7
A	WO 95 28412 A (GUSTAFSSON KENTH T ;INST OF CHILD HEALTH (GB); BAETSCHER MANFRED W) 26. Oktober 1995 (1995-10-26) Zusammenfassung; Ansprüche	11
A	WO 94 05333 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 17. März 1994 (1994-03-17) Ansprüche Seite 15, Zeile 7 - Zeile 19 Seite 26 -Seite 27	1,2,5,6, 8,9
A	CHIANG, M.-Y. ET AL.: "Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule-1 expression by two distinct mechanisms" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 266, 25. September 1991 (1991-09-25), Seiten 18162-18171, XP002134405 ISSN: 0021-9258 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,2,6,8
A	PATZEL V. ET AL.: "Theoretical design of antisense RNA structures substantially improves annealing kinetics and efficacy in human cells " NAT BIOTECHNOL 1998 JAN;16(1):64-8, XP002085109	
T	PATZEL V. ET AL.: "A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability." NUCLEIC ACIDS RES 1999 NOV 15;27(22):4328-34, XP002134406	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06972

### Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

### Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

**Siehe Zusatzblatt**

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p> <p>1. Ansprüche: 1-11 (alle teilweise)</p> <p>Antisense Nukleinsäuren die gegen die ICAM-1 Zielsequenz SEQ ID 31 (pos.1627-1671) gerichtet sind, Vektoren, Wirtszellen, Zusammensetzungen, Diagnose-Kits und Transgene Organismen die sie enthalten, und deren Verwendungen.</p> <p>2. Ansprüche: 1-11 (alle teilweise)</p> <p>Antisense Nukleinsäuren die gegen die ICAM-1 Zielsequenz SEQ ID 32 (pos.59-82) gerichtet sind, Vektoren, Wirtszellen, Zusammensetzungen, Diagnose-Kits und Transgene Organismen die sie enthalten, und deren Verwendungen.</p> <p>3. Ansprüche: 1-11 (alle teilweise)</p> <p>Antisense Nukleinsäuren die gegen die ICAM-1 Zielsequenz SEQ ID 33 (pos.593-634) gerichtet sind, Vektoren, Wirtszellen, Zusammensetzungen, Diagnose-Kits und Transgene Organismen die sie enthalten, und deren Verwendungen.</p> <p>4. Ansprüche: 1-11 (alle teilweise)</p> <p>Antisense Nukleinsäuren die gegen die ICAM-1 Zielsequenz SEQ ID 34 (pos.1219-1242) gerichtet sind, Vektoren, Wirtszellen, Zusammensetzungen, Diagnose-Kits und Transgene Organismen die sie enthalten, und deren Verwendungen.</p> <p>5. Ansprüche: 1-11 (alle teilweise)</p> <p>Antisense Nukleinsäuren die gegen die ICAM-1 Zielsequenz SEQ ID 35 (pos.1384-1410) gerichtet sind, Vektoren, Wirtszellen, Zusammensetzungen, Diagnose-Kits und Transgene Organismen die sie enthalten, und deren Verwendungen.</p> <p>6. Ansprüche: 1-11 (alle teilweise)</p> <p>Antisense Nukleinsäuren die gegen die ICAM-1 Zielsequenz SEQ ID 36 (pos.1851-1874) gerichtet sind, Vektoren, Wirtszellen, Zusammensetzungen, Diagnose-Kits und Transgene Organismen die sie enthalten, und deren Verwendungen.</p>	

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p><b>Fortsetzung von Feld I.1</b></p> <p>Obwohl die Ansprüche 8 (insofern es sich um eine <i>in vivo</i> Verwendung handelt) und 6-7 und 9 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06972

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9824797 A	11-06-1998		AU 1564897 A		29-06-1998
			EP 0950060 A		20-10-1999
WO 9528412 A	26-10-1995		AU 1850599 A		29-04-1999
			AU 2233295 A		10-11-1995
			CA 2187802 A		26-10-1995
			EP 0755402 A		29-01-1997
			JP 10504442 T		06-05-1998
WO 9405333 A	17-03-1994		US 5591623 A		07-01-1997
			US 5514788 A		07-05-1996
			AU 673193 B		31-10-1996
			AU 4840193 A		29-03-1994
			AU 690858 B		30-04-1998
			AU 6449896 A		05-12-1996
			CA 2143748 A		17-03-1994
			EP 0662003 A		12-07-1995
			FI 950948 A		18-04-1995
			HU 69922 A		28-09-1995
			JP 2948541 B		13-09-1999
			JP 9182594 A		15-07-1997
			JP 2937903 B		23-08-1999
			JP 9182595 A		15-07-1997
			JP 2732546 B		30-03-1998
			JP 8500736 T		30-01-1996
			KR 178958 B		20-03-1999
			NO 950800 A		24-04-1995
			NZ 256171 A		20-12-1996
			US 5883082 A		16-03-1999
			US 5843738 A		01-12-1998
			US 5789573 A		04-08-1998
			US 6015894 A		18-01-2097